

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭59-25333

SInt. Cl.¹

識別記号

序内整理番号

⑫ 公開 昭和59年(1984)2月9日

A 61 K 45/02

7043-4C

C 07 G 7/00

6956-4H

// C 12 N 15/00

7115-4B

C 12 P 21/00

7235-4R

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑬ 特許 昭57-135422
⑭ 出 願 昭57(1982)8月3日
⑮ 発 明 者 小沢均鎌倉市手広1111番地東レ株式会社
社基礎研究所内
東レ株式会社
東京都中央区日本橋京町2丁目
2番地

明 細 書

1. 発明の名称

増殖を持たないインターフェロン- β の安定
化方法

2. 特許請求の範囲

- (1) 増殖を持たないインターフェロン- β にポリマーを添加することを特徴とする増殖を持たないインターフェロン- β の安定化方法。
 - (2) 増殖を持たないインターフェロン- β が組換えDNA技術により微生物から生産されるインターフェロン- β である特許請求の範囲第1項記載の方法。
 - (3) ポリマーがグリセリンである特許請求の範囲第1項記載の方法。
 - (4) ポリマーが蔗糖である特許請求の範囲第1項記載の方法。
 - (5) ポリマーの濃度が5%以上である特許請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 発明の詳細な説明
- 本発明はインターフェロン- β の安定化方法

に関する。特に増殖を持たないインターフェロン- β 分子の安定化方法に関する。

インターフェロン (IFN) はウイルスや二本鎖DNAなどの刺激によつて、動物細胞が産生するウイルス増殖抑制作用あるいは抗癌作用など広範囲な生物活性を有するある種の蛋白質であり、その作用は種特異性を有することが知られている。

ヒトインターフェロンは現在3種類の存在が知られている。即ち白血球細胞等が産生する α 型、せいの平細胞等が産生する β 型およびリンパ球等が産生する γ 型があり、化学構造および生物活性に差異があることが証明されている。

ヒトに対して有効なインターフェロンはヒト細胞によつてのみ生産されるため、大量のインターフェロンを得るには大きな困難が伴つて来た。最近組換えDNA技術の発達によりIFN- α 、IFN- β 、IFN- γ は大規模、イーストなど微生物を用いて生産することが可能となり、大量のインターフェロンを生産する見通

しを得られるにいたっている。(Goodell, D. V. et al., Nucleic Acid Research, 8, 4057 (1980), Nature, 287, 411 (1980), Nature 295, 505 (1982))。ヒトせんい芽細胞が産生するインターフェロン β （以下IFN- β と略す）は分子量約23000 \pm 2000の単タンパク質であり、タンパク質部分の分子量は約20000、これに分子量5000前後の糖が結合した物質である。一方、インターフェロン β 遺伝子で置換えた大腸菌などの微生物が産生するインターフェロン β （以下O-IFN- β と略す）は糖を結合していない分子量約20000の単タンパク質であり、この点で天然のIFN- β と異なった物質であり、従つて化学的性質、生物学的性質において両者の間には若干の相異が認められる。

インターフェロン β はそれ自体相當に不安定な物質であるが、O-IFN- β もある面においては一層不安定な物質で容易に失活する物質であることが明らかとなつてきた。即ち、安

定性の代表的指標である熱安定性を比較すると、第1図に示したようにO-IFN- β はIFN- β より約15 $^{\circ}$ 低い温度で失活する。O-IFN- β の不安定性はこれを医薬品として臨床的に使用する際に大きな欠点になると考えられる。

本発明者らはO-IFN- β の不安定性を改善すべく調査検討を続け、結果本発明に到達した。

即ち本発明は、糖鎖を持たないインターフェロン β にポリオールを添加することを特徴とするインターフェロン β の安定化方法を提供するものである。

本発明の糖鎖を持たないインターフェロン β とは、IFN- β 遺伝子で置換えた大腸菌等の微生物が産生するIFN- β (O-IFN- β)であり、分子量約20000の単タンパク質である。本発明のO-IFN- β はたとえ、特開昭52350(1980)により次の様にして製造すると

とができる。

インターフェロン β を産生するヒト細胞芽細胞からm-RNA混合物を単離し、これに対応するc-DNAを作製して、大腸菌のプラスミドpH11322と融合させ、インターフェロン β の構造遺伝子を持つ大腸菌を得る。この時インターフェロンの構造遺伝子が、大腸菌中で発現してインターフェロンタンパク質を生産するためには、構造遺伝子の上位にc-DNAをm-RNAに転写するプロモーター配列を融合させ、かつ生じたm-RNAがリボソームと融合して、タンパク質に翻訳されるSD配列などを持つ必要がある。そのために、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、SD配列の下流にインターフェロン β の構造遺伝子を融合させる。ここで用いたプロモーター領域とIFN- β の構造遺伝子を持つプラスミド(pL117R)で大腸菌HB101を組みかえる。

このようにして得られた組換え体をLB培地中で前培養し、これを新しいLB培地中に約2

日に接種し、50 $^{\circ}$ で長時間培養した後接種し、夜中後、リン酸処理して細胞壁を溶解後凍結溶解し、遠心分離すると、大腸菌の菌体内に生産留積していたO-IFN- β が可溶性され、インターフェロン活性を示す抽出液が得られる。

本発明のポリオールとしては、たとえばグリセリン、エタレングリコールまたは糖類が挙げられる。糖類の中では多糖類以外の糖すなわち単糖類、オリゴ糖が好ましい。特に好ましいポリオールは、グリセリン、蔗糖である。ポリオールの濃度は5%以上、特に10~30%が好ましい。

以下実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

実施例

ヒトIFN- β の遺伝子を含むプラスミドpL117Rを保持する大腸菌HB101(T, Taubiguchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 5230 (1980))をLB培地中で前培養し、これを1%のLB培地に約2%接種した。50 $^{\circ}$

で極端清浄し菌数0.1460が0.6に達した点で
 検出し、25%蔗糖を含む50mM Tris緩衝液
 pH8.0で菌を洗浄し、遠心で集菌した。菌体を
 2.0mlの20mM RDTA-50mM Tris緩衝液pH
 8.0に懸濁し、2.0ml/mlのリゾチームを加え、
 0℃、30分静置後、2回凍結融解をくり返して
 消化した。消化液を15000回転60分の遠心
 を行ない上清液をO-IPN-Aの原液として、
 安定性試験の材料とした。P-IPN-Aは人
 胎胚芽細胞が産生した原液を部分精製した物を
 使用した。(R. Kobayashi et. al., "The
 Clinical Potential of Interferon", Japan
 Medical Research Foundation Publication
 No. 15, P.60 (1980) University of Tokyo
 Press)。O-IPN-A原液は1100U/ml、P-
 IPN-A原液は550U/mlの活性がOPN
 -50法(PL-細胞-VAV系)で認められ
 た。

第1例に、両原液を各種温度5分間加熱中
 加熱した際の失活曲線を示した。O-IPN-A

よりも熱失活を耐しやすく、50%失活を耐
 温度はそれぞれ41℃および55℃であり、
 14%の差異が認められた。

実施例1

参考例に示したようにO-IPN-Aは熱に
 定性がP-IPN-Aよりも悪い。特に40℃
 -50℃の間でその差が顕著である。そこでO-
 IPN-A原液およびP-IPN-A原液と
 80%グリセリン清液を混和して、グリセリン
 濃度を5~50%とした。(IPN活性は同じ)
 この清液を43℃、5分間加熱して残存する活性
 を測定して第2の結果を得た。第2図からO-
 IPN-Aの43℃、5分間加熱による失活
 (約80%)は10%以上のグリセリンの存在
 で完全に保護される。50%の存在下ではやや
 活性の増強が見られた。

実施例2

20%グリセリンおよび20%蔗糖のO-
 IPN-Aの熱失活保護効果調べた。表1に
 示すようにその結果を示した。無添加の場合48

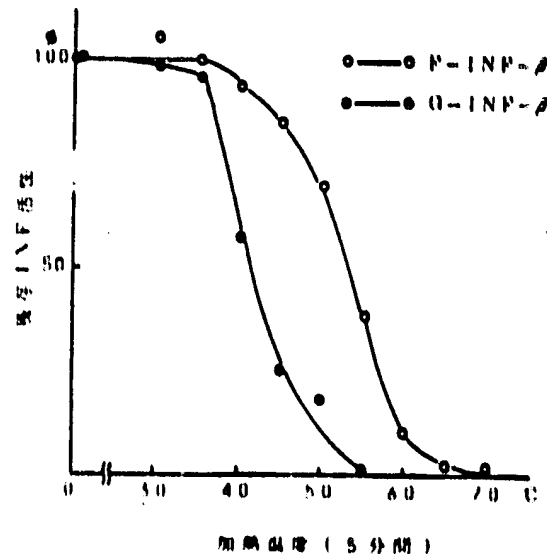
で、5分の加熱で約55%失活したが、グリセ
 リン又は蔗糖の添加でこの失活はほぼ完全に保
 護された。

表1 O-IPN-Aを43℃、
 5分間加熱失活に対するグ
 リセリンの保護効果

添 加 物	残 存 活 性
無 添 加	44%
20%グリセリン	93%
20%蔗 糖	87%

4. 図面の簡単な説明

第1図は各種温度で5分間加熱した時のP-
 IPN-AおよびO-IPN-Aの活性残存率
 を示し、第2図はグリセリンを添加して43℃
 で5分間加熱した時のO-IPN-Aの活性残
 存率を示す。



第1図

特許出願人 東 洋 薬 業 有 限 公 司

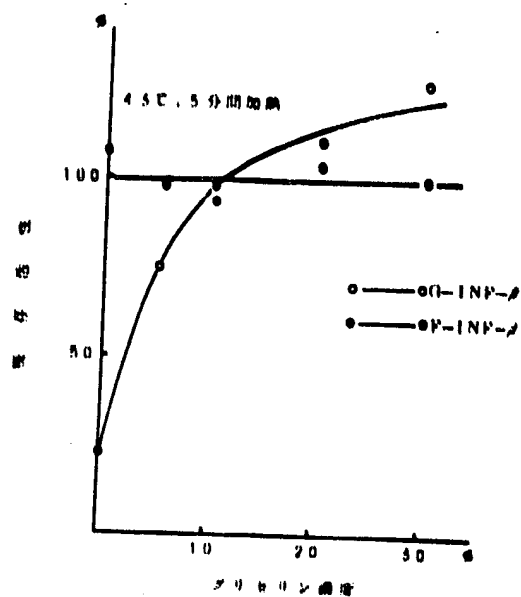


図 2 例